

日本国特許庁  
JAPAN PATENT OFFICE

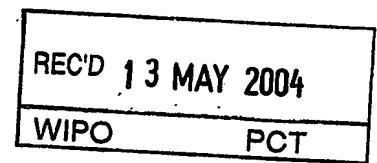
PCT/JP03/15418  
02.1203

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日 2002年12月13日  
Date of Application:

出願番号 特願2002-363014  
Application Number:  
[ST. 10/C]: [JP 2002-363014]



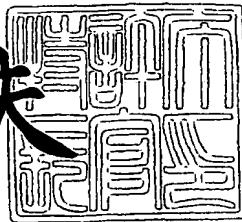
出願人 独立行政法人 科学技術振興機構  
Applicant(s):

PRIORITY DOCUMENT  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

2004年 4月23日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

今井康夫



出証番号 出証特2003-3109533

【書類名】 特許願  
【整理番号】 Y2002-P281  
【提出日】 平成14年12月13日  
【あて先】 特許庁長官殿  
【国際特許分類】 C12N 15/12  
A61K 38/00  
G01N 33/50

## 【発明者】

【住所又は居所】 京都府京都市左京区高野東開町1-23東大路高野第3  
住宅43棟205号

【氏名】 乾 賢一

## 【発明者】

【住所又は居所】 京都府京都市左京区松ヶ崎井出ヶ海道町5-1 G R A  
C E と一ベえ 403号室

【氏名】 増田 智先

## 【特許出願人】

【識別番号】 396020800  
【氏名又は名称】 科学技術振興事業団  
【代表者】 沖村 憲樹

## 【代理人】

【識別番号】 100107984

## 【弁理士】

【氏名又は名称】 廣田 雅紀

## 【手数料の表示】

【予納台帳番号】 044347  
【納付金額】 21,000円

## 【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1  
【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 0013099

【ブルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 グルコーストランスポータNaGLT1及びその遺伝子

【特許請求の範囲】

【請求項1】 配列表の配列番号1に示される塩基配列若しくはその相補的配列又はこれらの配列の一部若しくは全部を含む配列からなることを特徴とするDNA。

【請求項2】 請求項1記載のDNAとストリンジエントな条件下でハイブリダイズし、かつグルコーストランスポータ機能を有するポリペプチドをコードすることを特徴とするDNA。

【請求項3】 以下の(a)又は(b)のポリペプチドをコードするDNA；

(a)配列表の配列番号2に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド

(b)配列表の配列番号2に示されるアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつグルコーストランスポータ機能を有するポリペプチド

【請求項4】 配列表の配列番号2に示されるアミノ酸配列からなることを特徴とするポリペプチド。

【請求項5】 配列表の配列番号2に示されるアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつグルコーストランスポータ機能を有するポリペプチド。

【請求項6】 請求項1～3記載のDNAを、発現ベクターに組込み、該組換え発現ベクターを宿主細胞に導入して発現することを特徴とするグルコーストランスポータ機能を有するポリペプチドの製造法。

【請求項7】 請求項4又は5記載のポリペプチドを用いて誘導され、該ポリペプチドに特異的に結合することを特徴とする抗体。

【請求項8】 抗体が、モノクローナル抗体であることを特徴とする請求項7記載の抗体。

【請求項9】 抗体が、ポリクローナル抗体であることを特徴とする請求項7記載の抗体。

【請求項10】 請求項1～3のいずれか記載のDNAを動物組織細胞に導

入することを特徴とするグルコーストランスポータ機能を有するポリペプチドを発現する動物組織細胞の製造法。

【請求項11】 動物組織細胞が、ラット腎臓の組織細胞、ブタ腎臓由来上皮細胞、イヌ腎臓由来上皮細胞、又はフクロネズミ腎臓由来上皮細胞であることを特徴とする請求項10記載のグルコーストランスポータ機能を有するポリペプチドを発現する動物組織細胞の製造法。

【請求項12】 動物組織細胞が、ヒト胎児腎臓の形質転換細胞株HEK293であることを特徴とする請求項10記載のグルコーストランスポータ機能を有するポリペプチドを発現する動物組織細胞の製造法。

【請求項13】 請求項10～12のいずれか記載の方法により製造されたことを特徴とするグルコーストランスポータ機能を有するポリペプチドを発現する動物組織細胞。

【請求項14】 請求項13記載のグルコーストランスポータ機能を有するポリペプチドを発現する動物組織細胞を用いて、被研物質のグルコース輸送機能への影響を測定することを特徴とするグルコーストランスポータ機能調節活性を有する物質のスクリーニング方法。

【請求項15】 配列表の配列番号2に示されるグルコーストランスポータ機能を有するポリペプチドを発現する遺伝子機能を染色体上で欠損させたことを特徴とする腎におけるグルコース再吸収能不全に起因する腎性糖尿病を発症するモデル非ヒト動物。

【請求項16】 グルコーストランスポータ機能を有するポリペプチドを発現する遺伝子機能の欠損が、配列表の配列番号1に示されるグルコーストランスポータ機能を有するポリペプチドを発現する遺伝子の機能の欠損であることを特徴とする請求項15記載の腎性糖尿病を発症するモデル非ヒト動物。

【請求項17】 請求項15又は16記載の腎におけるグルコース再吸収能不全に起因する腎性糖尿病を発症するモデル非ヒト動物に、被検物質を投与し、該モデル非ヒト動物、或いは該モデル非ヒト動物の細胞、組織又は器官におけるグルコース再吸収能を測定・評価することを特徴とするグルコース再吸収能不全に起因する腎性糖尿病予防・治療薬のスクリーニング方法。

【請求項18】 請求項1記載の塩基配列のアンチセンス鎖の全部又は一部からなるグルコーストランスポータ機能診断用プローブ。

【請求項19】 請求項1～3のいずれか記載のDNAの少なくとも1つ以上を固定化させたことを特徴とするグルコーストランスポータ機能診断用マイクロアレイ又はDNAチップ。

【請求項20】 請求項7～9のいずれか記載の抗体及び／又は請求項18記載の診断用プローブを用意することを特徴とするグルコーストランスポータ機能診断用薬剤。

【請求項21】 被検組織から試料を得、該試料における請求項1記載の遺伝子の発現を測定することを特徴とするグルコーストランスポータ機能の診断方法。

【請求項22】 請求項21記載の遺伝子の発現の測定を、請求項18記載のグルコーストランスポータ機能診断用プローブ、或いは請求項19記載のグルコーストランスポータ機能診断用マイクロアレイ又はDNAチップを用いて行うことを特徴とするグルコーストランスポータ機能の診断方法。

【請求項23】 被検組織から試料を取得、培養し、該試料における遺伝子の発現により生成される請求項4記載のポリペプチドを測定することを特徴とするグルコーストランスポータ機能の診断方法。

【請求項24】 請求項23記載のポリペプチドの測定を、請求項7～9のいずれか記載の抗体を用いて行うことを特徴とするグルコーストランスポータ機能の診断方法。

【請求項25】 請求項21～24のいずれか記載のグルコーストランスポータ機能の診断が、腎疾患におけるグルコーストランスポータ機能の測定であることを特徴とする腎疾患の診断方法。

【請求項26】 動物組織細胞に、請求項1～3のいずれか記載のDNAを導入することを特徴とする動物組織細胞におけるグルコーストランスポータ機能の調節方法。

【請求項27】 動物組織細胞における請求項1記載のDNAの発現を抑制することを特徴とする動物組織細胞におけるグルコーストランスポータ機能の調

節方法。

**【請求項28】** 動物組織細胞における請求項1記載のDNAの発現の抑制が、請求項1記載のDNA塩基配列のアンチセンス鎖の全部又は一部を動物組織細胞に導入することにより行われることを特徴とする動物組織細胞グルコーストランスポータ機能の調節方法。

**【請求項29】** 動物組織細胞が、動物腎細胞であることを特徴とする請求項26～28のいずれか記載の動物組織細胞におけるグルコーストランスポータ機能の調節方法。

**【発明の詳細な説明】**

**【0001】**

**【発明の属する技術分野】**

本発明は、グルコーストランスポータ、その遺伝子、その変異体、及びそれらの利用に関する。

**【0002】**

**【従来の技術】**

ヒトの腎臓は2つ合わせても体重のわずか0.5%に過ぎないが、心拍出量の約20%、即ち毎分1～1.2Lもの血液が流れ込んでいる。その血漿流量の約20%、即ち毎分120mL（1日200L）が糸球体で濾過され原尿となるが、その99%は尿細管で再吸収され、残りの1.5～2Lが1日の尿量となる。腎臓は機能単位であるネフロンとそれを取りまく血管系から構成されている。ネフロンは糸球体に始まり、近位尿細管、中間部尿細管（ヘンレループ細脚）、遠位尿細管を経て集合管系に至る。それぞれの分節は異なった機能と形態を有し、協同的に尿の濃縮・生成に関与している。特に、近位尿細管を構成する細胞では管腔側刷子縁膜の発達により表面積が大きいため、原尿中の水や電解質の他低分子性の栄養物質を再吸収したり、血液中の薬物や異物を分泌する際に効率的な形態となっている（月刊薬事 Vol.43, No.3, pp29-34, 2001、月刊薬事 Vol.42, No.4, pp113-120, 2000）。

**【0003】**

近位尿細管上皮細胞の血液側側底膜と管腔側刷子縁膜には、このように多様な

物質の再吸収と分泌を媒介するトランスポータ（輸送体）が局在し、方向選択性的な物質輸送を可能とするネットワークが形成されている（BIO Clinica, 11, 22-25, 1996、生体の科学、50, 268-273, 1999）。この数年間に、グルコースの腎排泄調節を司るグルコーストランスポータの遺伝子のクローニングと、構造・機能解析が著しく進展し、腎臓において、糸球体で尿中へ移行したグルコースが、再吸収されて血液中へ戻される機構が分子レベルで明らかにされつつある。

#### 【0004】

即ち、血中グルコースは腎糸球体で濾過され、尿細管で再吸収を受ける。この機構により正常血糖時には、グルコースは100%再吸収され循環血中に戻る。

そこで、グルコースやアミノ酸等の水溶性分子やイオンは、リン脂質二重層からなる生体膜を速やかに通過することができないために、一般的には、細胞膜や膜小器官にはこれらの分子を特異的に輸送するための輸送タンパク質が存在する。このような細胞内外の物質輸送を行う膜タンパク質が、トランスポータであるが、トランスポータは、体内に取りこまれた薬物、栄養物等が各組織に移動する過程や、各組織に蓄積した老廃物の排出に関与している（特開2002-171980号公報）。腎臓においては、近位尿細管上皮細胞の血液側側底膜と管腔側刷子縁膜に、多様な物質の再吸収と分泌を媒介するトランスポータ（輸送タンパク質）が局在し、細胞内外に形成された膜電位差やPH勾配等の環境特性を巧みに利用した方向選択性的な物質輸送を可能とするネットワークが形成されている（BIO Clinica, 11, 22-25, 1996、生体の科学、50, 268-273, 1999）。

#### 【0005】

脊椎動物のグルコーストランスポータは、大きく2種類に分けられる。1つは促進グルコーストランスポータ（facilitated glucose transporter: GLUT）とよばれるもので、細胞内外のグルコース濃度勾配にしたがって輸送を行う促進拡散型の輸送担体である。このタンパク質はさらに8つのアイソフォームが存在し、分子量約50,000の12回膜貫通型タンパク質である（Annu. Rev. Physiol. 55, 591-608, 1993、TIBS 23, 476-481, 1998、特開2002-218981号公報）。基本的に、すべての細胞は少なくとも1つのタイプのGLUTを発現させ、それによって必要なグルコースを細胞外から得ている。もう1つは

、 $\text{Na}^+$ ／グルコーストランスポータ ( $\text{Na}^+$ -glucose cotransporter: SGLT) で、 $\text{Na}^+$ イオンと共に作用することでグルコースを濃度勾配に逆らって輸送する能動輸送担体であり、分子量約75,000の14回膜貫通型タンパク質である。

### 【0006】

このタンパク質は小腸と腎臓の管腔 (lumen) 側に面した上皮細胞の頂端側細胞膜 (apical membrane) に存在し、細胞内外の $\text{Na}^+$ の電気化学ポテンシャルの勾配を利用してグルコースを細胞内へ取り込む能動輸送を行っている (Physiol. Rev. 74, 993-1026, 1994, Am. J. Physiol. 276, (5 Pt 1), G1251-1259, 1999、特開2002-218981号公報)。SGLTによって上皮細胞内に取り込まれたグルコースと $\text{Na}^+$ は、側底膜 (baso-lateral membrane) に存在するGLUT-2と $\text{Na}^+-\text{K}^+$ ポンプの働きで血中へ放出される。

### 【0007】

哺乳類のSGLTは、輸送特性によって更に、SGLT-1とSGLT-2の二つのタイプに分類される。SGLT-1は、糖1分子あたり2個の $\text{Na}^+$ イオンを輸送し、グルコースとガラクトースに対して高い親和性を持ち、小腸と腎臓で発現している。一方、SGLT-2は糖1分子あたり1個の $\text{Na}^+$ イオンを輸送し、グルコースに対する親和性は低く、ガラクトースは運ばない。このタンパク質は腎臓で発現しているが、小腸での発現は確認されていない。更に、SGLT-1とSGLT-2は腎臓の異なる場所で機能している。糸球体で尿中へ移行したグルコースは、その多くが、まず近位尿細管のSGLT-2で再吸収され、更に遠位尿細管のSGLT-1で完全に再吸収され血液中へ戻される。これに対して、食物中のグルコースは総て、小腸のSGLT-1で体内へ吸収されている。

### 【0008】

このように、腎臓にはグルコーストランスポータ SGLT1及びSGLT2が発現しており、糸球体で濾過されたグルコースの尿細管上皮細胞内への再吸収過程は、これら2種類のトランスポータによって媒介されると考えられている。

一方で、腎性糖尿病とされる、血漿中のグルコースの濃度が正常域 (170mg/dL以下) であるのに、明らかな糖尿の見られる状態がある。糸球体を通過

したグルコースが尿細管で再吸収され得る最大速度 ( $T_{mG}$  で表す) は正常人では毎分  $350 \text{ mg}$  であるが、これが異常に低い場合が最も多い。その結果、血漿中のグルコース濃度の高低に関係なく尿中のグルコース濃度が異常に高くなる。この現象は、近位尿細管の異常、即ち先天的あるいは後天的ファコンニ症候群のときやフロリジン注射の後などにも見られる。もう一つの腎性糖尿病の原因としては、グルコースのみかけ上の閾値が低下しているが閾値の平均値と  $T_{mG}$  との両者がまったく正常という場合もある。この場合に見られるグルコースの尿中への異常な排泄増加は、グルコースの血漿濃度が低いときのみに存在する。そして、最大閾値を越えた血漿レベルでのグルコースの排泄はかえって正常である（医学大辞典 第18版, pp 1059~1060, 南山堂, 1998年、生化学辞典 第2版, pp 673, 東京化学同人, 1990年）。

#### 【0009】

腎性糖尿病は、腎臓におけるグルコース再吸収不全によると考えられており、かかるグルコース再吸収不全は、腎臓において糸球体で濾過されたグルコースの尿細管上皮細胞内への再吸収過程を媒介していると考えられている既知の2種類のトランスポータ、即ち、SGLT1及びSGLT2の先天性或いは後天性の欠損に起因すると考えられている。しかしながら、未だ原因遺伝子については同定されておらず、該既知のSGLT1及びSGLT2遺伝子とそれ以外の未だ未知のトランスポータ遺伝子の先天的或いは後天的欠損によって引き起こされると考えられてきた。

また、腎疾患を、標的或いは回避することを目的とした医薬品の開発は、腎疾患時における薬物療法をより有効かつ安全に実施するために重要であるが、今までの腎疾患の原因の解明に対する技術的な研究基盤が乏しいために、有効な成功例がないのが現状である。

#### 【0010】

##### 【特許文献1】

特開2002-171980号公報。

##### 【特許文献2】

特開2002-218981号公報。

**【非特許文献1】**

BIO Clinica, 11, 22-25, 1996。

**【非特許文献2】**

生体の科学, 50, 268-273, 1999。

**【非特許文献3】**

Annu. Rev. Physiol. 55, 591-608, 1993。

**【非特許文献4】**

TIBS 23, 476-481, 1998。

**【非特許文献5】**

Physiol. Rev. 74, 993-1026, 1994。

**【0011】****【発明が解決しようとする課題】**

本発明の課題は、腎において発現し、腎でのグルコース再吸収に関する新規グルコーストランスポータ、その遺伝子、及びそれらの変異体、更にはそれらの利用を提供することにある。

**【0012】****【課題を解決するための手段】**

腎性糖尿病は、腎臓におけるグルコース再吸収不全によるものであり、かかる不全は既知のグルコーストランスポータ遺伝子SGLT1及びSGLT2の先天性或いは後天性の欠損に起因すると考えられていたが、その原因遺伝子については、同定されないできた。本発明者は、この未同定の遺伝子について、鋭意探索の結果、既知のSGLT1及びSGLT2グルコーストランスポータ遺伝子とは別の腎臓で高発現する遺伝子を見い出し、本発明を完成するに至った。

本発明のグルコーストランスポータは、既知のSGLT1及びSGLT2よりも高い発現量を有し、腎でのグルコース再吸収において、より大きな寄与を果たすとともに、他の単糖類は認識せずに、グルコースのみを特異的に認識するという特性を有する。本発明のグルコーストランスポータを、「グルコーストランス

ポータN a G L T 1」と命名した。

### 【0013】

本発明は、また、グルコーストランスポータN a G L T 1及びその遺伝子の変異体、及び該グルコーストランスポータN a G L T 1に特異的に結合する抗体を包含する。更に本発明は、本発明のグルコーストランスポータ機能を有するポリペプチドを発現する遺伝子機能を染色体上で欠損させた腎性糖尿病を発症するモデル非ヒト動物及び該モデル非ヒト動物を用いた腎性糖尿病の予防・治療薬のスクリーニング、更には、本発明の遺伝子や抗体を用いたグルコーストランスポータ機能や腎疾患の診断方法やそのための診断薬を包含するものである。また、本発明は、アンチセンス鎖DNA等を用いて、本発明の遺伝子の発現を制御し、動物組織細胞におけるグルコーストランスポータ機能を調節する方法も包含するものである。

### 【0014】

すなわち具体的には本発明は、配列表の配列番号1に示される塩基配列若しくはその相補的配列又はこれらの配列の一部若しくは全部を含む配列からなることを特徴とするDNA（請求項1）や、請求項1記載のDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつグルコーストランスポータ機能を有するポリペプチドをコードすることを特徴とするDNA（請求項2）や、以下の(a)又は(b)のポリペプチドをコードするDNA；(a)配列表の配列番号2に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド(b)配列表の配列番号2に示されるアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつグルコーストランスポータ機能を有するポリペプチド（請求項3）や、配列表の配列番号2に示されるアミノ酸配列からなることを特徴とするポリペプチド（請求項4）や、配列表の配列番号2に示されるアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつグルコーストランスポータ機能を有するポリペプチド（請求項5）や、請求項1～3記載のDNAを、発現ベクターに組込み、該組換え発現ベクターを宿主細胞に導入して発現することを特徴とするグルコーストランスポータ機能を有するポリペプチドの製造法（請求項6）や、請求項4又は5記載の

ポリペプチドを用いて誘導され、該ポリペプチドに特異的に結合することを特徴とする抗体（請求項7）や、抗体が、モノクローナル抗体であることを特徴とする請求項7記載の抗体（請求項8）や、抗体が、ポリクローナル抗体であることを特徴とする請求項7記載の抗体（請求項9）からなる。

### 【0015】

また本発明は、請求項1～3のいずれか記載のDNAを動物組織細胞に導入することを特徴とするグルコーストランスポータ機能を有するポリペプチドを発現する動物組織細胞の製造法（請求項10）や、動物組織細胞が、ラット腎臓の組織細胞、ブタ腎臓由来上皮細胞、イヌ腎臓由来上皮細胞、又はクロネズミ腎臓由来上皮細胞であることを特徴とする請求項10記載のグルコーストランスポータ機能を有するポリペプチドを発現する動物組織細胞の製造法（請求項11）や、動物組織細胞が、ヒト胎児腎臓の形質転換細胞株HEK293であることを特徴とする請求項10記載のグルコーストランスポータ機能を有するポリペプチドを発現する動物組織細胞の製造法（請求項12）や、請求項10～12のいずれか記載の方法により製造されたことを特徴とするグルコーストランスポータ機能を有するポリペプチドを発現する動物組織細胞（請求項13）や、請求項13記載のグルコーストランスポータ機能を有するポリペプチドを発現する動物組織細胞を用いて、被検物質のグルコース輸送機能への影響を測定することを特徴とするグルコーストランスポータ機能調節活性を有する物質のスクリーニング方法（請求項14）や、配列表の配列番号2に示されるグルコーストランスポータ機能を有するポリペプチドを発現する遺伝子機能を染色体上で欠損させたことを特徴とする腎におけるグルコース再吸収能不全に起因する腎性糖尿病を発症するモデル非ヒト動物（請求項15）や、グルコーストランスポータ機能を有するポリペプチドを発現する遺伝子機能の欠損が、配列表の配列番号1に示されるグルコーストランスポータ機能を有するポリペプチドを発現する遺伝子の機能の欠損であることを特徴とする請求項15記載の腎性糖尿病を発症するモデル非ヒト動物（請求項16）や、請求項15又は16記載の腎におけるグルコース再吸収能不全に起因する腎性糖尿病を発症するモデル非ヒト動物に、被検物質を投与し、該モデル非ヒト動物、或いは該モデル非ヒト動物の細胞、組織又は器官におけるグル

コース再吸収能を測定・評価することを特徴とするグルコース再吸収能不全に起因する腎性糖尿病予防・治療薬のスクリーニング方法（請求項17）や、請求項1記載の塩基配列のアンチセンス鎖の全部又は一部からなるグルコーストランスポータ機能診断用プローブ（請求項18）や、請求項1～3のいずれか記載のDNAの少なくとも1つ以上を固定化させたことを特徴とするグルコーストランスポータ機能診断用マイクロアレイ又はDNAチップ（請求項19）からなる。

### 【0016】

さらに本発明は、請求項7～9のいずれか記載の抗体及び／又は請求項18記載の診断用プローブを用意することを特徴とするグルコーストランスポータ機能診断用薬剤（請求項20）や、被検組織から試料を得、該試料における請求項1記載の遺伝子の発現を測定することを特徴とするグルコーストランスポータ機能の診断方法（請求項21）や、請求項21記載の遺伝子の発現の測定を、請求項18記載のグルコーストランスポータ機能診断用プローブ、或いは請求項19記載のグルコーストランスポータ機能診断用マイクロアレイ又はDNAチップを用いて行うことを特徴とするグルコーストランスポータ機能の診断方法（請求項22）や、被検組織から試料を取得、培養し、該試料における遺伝子の発現により生成される請求項4記載のポリペプチドを測定することを特徴とするグルコーストランスポータ機能の診断方法（請求項23）や、請求項23記載のポリペプチドの測定を、請求項7～9のいずれか記載の抗体を用いて行うことを特徴とするグルコーストランスポータ機能の診断方法（請求項24）や、請求項21～24のいずれか記載のグルコーストランスポータ機能の診断が、腎疾患におけるグルコーストランスポータ機能の測定であることを特徴とする腎疾患の診断方法（請求項25）や、動物組織細胞に、請求項1～3のいずれか記載のDNAを導入することを特徴とする動物組織細胞におけるグルコーストランスポータ機能の調節方法（請求項26）や、動物組織細胞における請求項1記載のDNAの発現を抑制することを特徴とする動物組織細胞におけるグルコーストランスポータ機能の調節方法（請求項27）や、動物組織細胞における請求項1記載のDNAの発現の抑制が、請求項1記載のDNA塩基配列のアンチセンス鎖の全部又は一部を動物組織細胞に導入することにより行われることを特徴とする動物組織細胞グルコ

ーストランスポータ機能の調節方法（請求項28）や、動物組織細胞が、動物腎細胞であることを特徴とする請求項26～28のいずれか記載の動物組織細胞におけるグルコーストランスポータ機能の調節方法（請求項29）からなる。

### 【0017】

#### 【発明の実施の形態】

（本発明の遺伝子、該遺伝子によってコードされるポリペプチド及びその抗体）

本発明は、腎性糖尿病の原因に関与するグルコーストランスポータNaGLT1及びその原因遺伝子、更にはそれらの変異体からなる。

本発明の腎性糖尿病の原因に関与するグルコーストランスポータNaGLT1cDNAは、配列表の配列番号1に示される塩基配列を有する。また、該cDNAによって、コードされるグルコーストランスポータNaGLT1タンパク質は、配列表の配列番号2に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドからなる。本発明において取得された新規遺伝子であるグルコーストランスポータNaGLT1のcDNAは、2, 173の塩基対からなり、その翻訳領域（111～1562番目）には、484個のアミノ酸残基からなるポリペプチドがコードされている。

### 【0018】

本発明のグルコーストランスポータNaGLT1は、疎水性解析の結果からは、11回膜貫通型の糖タンパク質であることが確認された。本発明の該グルコーストランスポータNaGLT1は、腎臓において高発現するグルコーストランスポータであり、他の単糖類は認識せずグルコースを特異的に認識する。腎臓におけるグルコーストランスポータNaGLT1の発現量は、既知のグルコーストランスポータSGLT1やSGLT2よりも高く、腎性糖尿病の原因と考えられている腎臓でのグルコースの再吸収に大きな寄与を果たしているものである。

### 【0019】

本発明の遺伝子としては、前記配列表の配列番号1に示される塩基配列若しくはその相補的配列又はこれらの配列の一部若しくは全部を含む配列、更には、該塩基配列とストリンジエントな条件下でハイブリダイズし、かつグルコーストランスポータ機能を有するポリペプチドをコードするDNA配列、及び、次の(a)

又は(b)のポリペプチドをコードするDNA；

(a)配列表の配列番号2に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド

(b)配列表の配列番号2に示されるアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつグルコーストランスポータ機能を有するポリペプチドを有するポリペプチド、を含むものである。

#### 【0020】

本発明において、種々のDNA配列の変異は、周知の遺伝子工学的遺伝子変異手段によって、行うことができる。

なお、上記本発明の塩基配列において、「塩基配列とストリンジエントな条件下ハイブリダイズする」条件としては、例えば、42℃でのハイブリダイゼーション、及び1×SSC、0.1%のSDSを含む緩衝液による42℃での洗浄処理を挙げることができ、65℃でのハイブリダイゼーション、及び0.1×SSC、0.1%のSDSを含む緩衝液による65℃での洗浄処理をより好ましく挙げができる。なお、ハイブリダイゼーションのストリンジエンシーに影響を与える要素としては、上記温度条件以外に種々の要素があり、当業者であれば種々の要素を組み合わせて、上記例示したハイブリダイゼーションのストリンジエンシーと同等のストリンジエンシーを実現することが可能である。

#### 【0021】

更に、本発明は、配列表の配列番号2に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド、該配列表の配列番号に示されるアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつグルコーストランスポータ機能を有するポリペプチドを含むものである。本発明のポリペプチドを取得するには、公知の遺伝子工学の技術を用いて取得することができる。即ち、本発明の遺伝子を適宜公知の発現ベクターに組込み、該組換えベクターを宿主細胞に導入し、発現することによって取得することができる。

#### 【0022】

(本発明のポリペプチドによって誘導される抗体の利用)

更に、本発明は、本発明のポリペプチドによって誘導され、該ポリペプチドに

特異的に結合する抗体を含む。該抗体としては、モノクローナル抗体及びポリクローナル抗体を挙げることができる。該抗体の作製は、本発明のポリペプチドを抗原として、常法により作製することができる。本発明の抗体は、本発明のグルコーストランスポータ機能を有するポリペプチドとの抗原抗体反応により、本発明遺伝子の腎組織細胞等における発現の有無の検出に利用することができ、該遺伝子に関わる腎疾患の診断に利用することができる。本発明の抗体を用いた免疫学的測定には、例えばRIA法、ELISA法、蛍光抗体法等公知の免疫学的測定法を用いることができる。

#### 【0023】

(本発明のDNAを導入したヒト組織細胞の利用)

本発明のDNAを、ヒト組織細胞に導入して、グルコーストランスポータ機能を有するポリペプチドを発現するヒト組織細胞を製造することができる。該ヒト組織細胞としては、本来Na<sub>1</sub>GT<sub>1</sub>が強く発現している腎臓の組織細胞を用いることが好ましく、該腎臓の組織細胞の具体例としては、ヒト胎児腎臓の形質転換細胞株HEK293を挙げることができる。また、本発明の遺伝子を導入する動物組織細胞としては、ラットの腎臓の組織細胞や、ブタ腎臓由来上皮細胞LLC-PK<sub>1</sub>、イヌ腎臓由来上皮細胞MDCK、フクロネズミ腎臓由来上皮細胞OKのいずれかの細胞を用いることもできる。本発明のDNAをヒト組織細胞に導入するには、トランسفエクション法等、適宜の遺伝子導入法を用いることができる。

#### 【0024】

(本発明の遺伝子及び該遺伝子によってコードされるポリペプチドの利用)

本発明において、ヒト腎細胞からクローニングしたNa<sub>1</sub>GT<sub>1</sub>の新規遺伝子は、該塩基配列のアンチセンス鎖を用いることにより、診断用プローブとして、腎組織細胞のグルコーストランスポータ機能の診断に用いることができる。また、該診断用プローブや前記本発明のポリペプチドに特異的に結合する抗体を用いて、グルコーストランスポータ機能の診断薬として、及び該診断薬を装備した診断用キットとして利用することができる。

#### 【0025】

更に、本発明のDNAを、少なくとも1つ以上デバイス上に固定して、グルコーストランスポータ機能の診断用マイクロアレイ又はDNAチップとして利用することができる。該マイクロアレイ及びDNAチップには、グルコーストランスポータの他の遺伝子等を合わせて固定し、診断に用いることができる。また、腎組織細胞における本発明の遺伝子の発現の状態を測定するには、RT-PCR法やノーザンプロッティング法等、公知の遺伝子の測定法を適宜用いることができる。本発明の診断法を用いて、腎組織細胞におけるグルコーストランスポータNaGLT1の遺伝子の発現の有無や発現の強度を測定することにより、ヒト腎臓における遺伝子疾患を検出することができる。

#### 【0026】

(本発明の遺伝子を用いたグルコーストランスポータ機能の調節)

ヒト組織細胞における本発明の遺伝子の発現の制御により、ヒト組織細胞におけるグルコーストランスポータ機能の調節を行うことができる。ヒト組織細胞における遺伝子の発現の制御は、ヒト組織細胞への本発明遺伝子の導入や、本発明遺伝子に対するアンチセンス鎖の導入による本発明遺伝子の発現抑制によって行うことができる。ヒト組織細胞への本発明遺伝子の導入方法としては、トランسفエクション法等の公知の遺伝子導入法を用いることができる。アンチセンス鎖のヒト組織細胞への導入には、この分野で通常用いられる方法を用いることができる。例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチドを、腎組織等のヒト組織細胞へ直接投与することができる。また、必要に応じて薬学的に許容される細胞内導入試薬、例えば、リポフェクチン試薬、リポフェクトアミン試薬、DOTA試薬、Tfx試薬、リポソーム及び高分子担体等と共に投与することができる。

腎臓等のヒト組織細胞におけるグルコーストランスポータ機能の調節により、腎臓等における遺伝子疾患の予防・治療が可能となる。

#### 【0027】

(本発明の遺伝子欠損モデル非ヒト動物及びその利用)

本発明の、腎性糖尿病を発症するモデル非ヒト動物とは、グルコーストランスポータNaGLT1遺伝子機能が染色体上で欠損することにより、腎臓におけるグルコース再吸収不全のような腎性糖尿病を発症する非ヒト動物をいう。本発明

における非ヒト動物としては、ラット、マウス、モルモット等の齧歯目動物を具体的に挙げることができ、本発明の腎性糖尿病の予防・治療薬のスクリーニングに用いるモデル非ヒト動物としては、マウス、ラットが特に有利に利用することができるが、これらに限定されるものではない。

本発明のN a G L T 1 遺伝子機能が染色体上で欠損したモデル非ヒト動物の作製は、公知の遺伝子欠損モデル非ヒト動物の作製方法を用いて作製することができる。以下に、N a G L T 1 遺伝子機能が染色体上で欠損したモデル非ヒト動物の作製方法を、N a G L T 1 遺伝子機能が染色体上で欠損したマウスを例にとつて説明する。

#### 【0028】

N a G L T 1 遺伝子機能が染色体上で欠損したマウス、すなわちホモ接合体変異マウス（-/-）は、例えば、ラット腎臓から構築したラット遺伝子ライブラリーより得られた遺伝子断片を用いて、N a G L T 1 遺伝子をスクリーニングし、スクリーニングされたN a G L T 1 遺伝子の一部又は全部を、例えば1 a c - Z 遺伝子、ネオマイシン耐性遺伝子等のマーカー遺伝子で置換し、必要に応じて、5'末端側にジフテリアトキシンAフラグメント（D T - A）遺伝子や単純ヘルペスウイルスのチミジンキナーゼ（H S V - t k）遺伝子等の遺伝子を導入してターゲッティングベクターを作製し、この作製されたターゲッティングベクターを線状化し、エレクトロポレーション（電気穿孔）法等によってE S 細胞に導入し、相同的組換えを行い、その相同的組換え体の中から、X - g a 1 による染色あるいはG 4 1 8 やガンシクロビル（G A N C）等の抗生物質に抵抗性を示すE S 細胞を選択する。この選択されたE S 細胞が目的とする組換え体かどうかをサザンプロット法等により確認することが好ましい。

#### 【0029】

上記組換えE S 細胞をマウスの胚盤胞中にマイクロインジェクションし、かかる胚盤胞を仮親のマウスに戻し、キメラマウスを作製する。このキメラマウスを野生型のマウスとインタークロスさせると、ヘテロ接合体変異マウス（+/-）を得ることができ、また、このヘテロ接合体変異マウスをインタークロスさせることによって、ホモ接合体変異マウス（-/-）を得ることができる。そして、

かかるホモ接合体変異マウスにN a G L T 1 遺伝子が欠損しているかどうかを確認する方法としては、例えば、このマウスのN a G L T 1 遺伝子の発現をウエスタンプロット法等により調べる方法がある。

#### 【0030】

本発明における、腎臓におけるグルコース再吸収不全に起因する腎性糖尿病の予防・治療薬のスクリーニングは、グルコーストランスポータN a G L T 1 遺伝子機能の染色体上での欠損により、腎臓におけるグルコース再吸収不全のような腎性糖尿病を発症する非ヒト動物に、被検物質を投与し、該モデル非ヒト動物、或いは該モデル非ヒト動物の細胞、組織又は器官におけるグルコース再吸収能を測定・評価することにより行う。

#### 【0031】

上記のように、腎臓におけるグルコース再吸収不全に起因する腎性糖尿病の予防・治療薬のスクリーニングをする際、野生型非ヒト動物及び／又はN a G L T 1 遺伝子機能が染色体上で欠損した非ヒト動物を用いて、グルコース再吸収不全に起因する腎性糖尿病を発症するモデル非ヒト動物の場合と比較・評価することが好ましく、野生型非ヒト動物としては、上記N a G L T 1 遺伝子機能が染色体上で欠損したモデル非ヒト動物と同種の動物を意味し、中でも同腹の動物を好適に例示することができ、N a G L T 1 遺伝子機能が染色体上で欠損した非ヒト動物は、文献 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97, 6132-6137, 2000) 記載の方法等によって作製することができる。N a G L T 1 遺伝子機能欠損型と、それらの同腹の野生型は、個体レベルで正確な比較実験・評価（解析）等を行うことができる点で同時に用いることが好ましい。

#### 【0032】

（本発明の遺伝子を用いたグルコーストランスポータ機能の調節）

動物組織細胞、特に腎臓における組織細胞における本発明の遺伝子の発現の制御により、動物組織細胞におけるグルコーストランスポータ機能の調節を行うことができる。動物組織細胞における遺伝子の発現の制御は、動物組織細胞への本発明遺伝子の導入や、本発明遺伝子に対するアンチセンス鎖の導入による本発明遺伝子の発現抑制によって行うことができる。動物組織細胞への本発明遺伝子の

導入方法としては、トランスフェクション法等の公知の遺伝子導入法を用いることができる。アンチセンス鎖の動物組織細胞への導入には、この分野で通常用いられる方法を用いることができる。例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチドを、腎組織等の動物組織細胞へ直接投与することができる。また、必要に応じて薬学的に許容される細胞内導入試薬、例えば、リポフェクチン試薬、リポフェクトアミン試薬、DOTAP試薬、Tfx試薬、リポソーム及び高分子担体等と共に投与することができる。

腎臓等の動物組織細胞におけるグルコーストランスポータ機能の調節により、腎性糖尿病等における遺伝子疾患の予防・治療が可能となる。

### 【0033】

#### 【実施例】

以下、実施例により本発明をより具体的に説明するが、本発明の技術的範囲はこれらの例示に限定されるものではない。

#### 【実施例】

(グルコーストランスポーターNaGLT1のcDNAクローニング)

ラット腎臓より、塩化セシウム密度勾配遠心法により全RNAを抽出し、この全RNAからオリゴdTセルロース(Stratagene社製)を用いてポリA+RNA(mRNA)を精製した。精製したmRNAは、cDNAライブラリー作製キット(Stratagene社製)を用いてラット腎cDNAライブラリーを作製した。このcDNAライブラリーから、無作為に1,000遺伝子を取り出し、ベクタープライマー(T3プライマー；5'-AATTAACCTCACTAAAGGG-3')を用いてシークエンスを行った。なお、NaGLT1の全長シークエンスについては、下記の表1に記載のとおりプライマー(配列表の配列番号3～12)を設計し(Proligo社に合成依頼)、RISA-384(島津社製)を用いたチェーンターミネーター法により解読を行い、GENETYX-MAC Version 10(SOFTWARE DEVELOPMENT社製、東京)を用いて配列表を作成した。実際のシークエンスは、RISA-384システムにより行った(島津ジェノミックリサーチ(株)に委託解析)。

### 【0034】

【表1】

プライマー	塩基配列(5' → 3')	NaGLT1に おける位置	配列 番号
フォワードプライマー：			
T3-1	TCGGAAATGGAGTTCCGTGG	105-124	3
T3-2	AGCTGCCTTACTGACTGCCATG	494-515	4
T3-3	TACGTATTCTCCTTCGCCACC	996-1016	5
T3-4	TGTGTAACATTGGCAGCCTGG	1144-1164	6
T3-5	TAACCCATAGCTGAGGTCTC	1699-1718	7
リバースプライマー：			
T7-1	CAGATAGTTGTGAGCCACCATGTG	2095-2072	8
T7-2	GAGTTGCTTAGAGACCTCAGC	1728-1708	9
T7-3	AGGTGGTGTACTGCTCAATCC	1293-1273	10
T7-4	TCTGAGGCAGGCTTCAAAGGATC	757-737	11
T7-5	AAAAGCACCCACCAACCACAG	409-388	12

## 【0035】

得られた遺伝子配列情報について、GanBank、EMBL、DDBJ及びPDBの各データベースに登録されている遺伝子配列との相同性解析をBLASTにより行い既知群と未知群に分けた。未知遺伝子約200種は、mRNAをmCap RNA Capping kit (Stratagene社製)を用いてインピトロ合成し、アフリカツメガエル卵母細胞発現系を用いた輸送実験を行った。その結果、代謝抵抗性の $\alpha$ -メチル-D-グルコピラノシド ( $\alpha$  Me G 1 c) を特異的に輸送するクローン (NaGLT1) を同定した (GeneBankアクセッションナンバー：AB089802)。単離されたNaGLT1 cDNAは2,173塩基対からなり (配列番号1)、その翻訳領域 (111~1562番目) には484個のアミノ酸残基からなるタンパク質 (配列番号2) がコードされていた (図1A)。疎水性解析の結果から、NaGLT1は11回膜貫通型の糖タンパク質であることが推測された (図1B)。

## 【0036】

(ノーザンプロット法及びRT-PCRによるNaGLT1の発現分布の解析)

ストリンジエントな条件下 [50%のホルムアミド、5×SSPE (1×SSPEの組成: 0.15M NaCl、10mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、及び1mM EDTA; pH 7.4)、5×デンハルト溶液、0.2%のSDS及び10 $\mu$ g/

mLのニシン精子由来のDNA、42°C]において [ $\alpha$ -32P] dCTP (Amersham社製) でNaGLT1のcDNA (全長) をPrime-a-Gene Labeling System (Promega社製) を用いて標識し、ラット各臓器からRNeasy mini RNA extraction kit (QIAGEN社製) を用いて全RNAを抽出し、をプロットしたナイロン膜 (Hybond N+ membrane: Amersham社製) とハイブリダイズさせた。ハイブリダイゼーションを行った後、2×SSC (1×SSCの組成: 0.15M NaCl、15mM クエン酸ナトリウム、pH 7.0) / 0.1%のSDSで10分間室温でプロットメンブレンを2度洗浄し、さらに0.5×SSC / 0.1% SDSで30分間42°Cで1度洗浄した。洗浄したプロットメンブレンをイメージングプレートに3~6時間露出し、可視化されたバンドをイメージングプレートリーダで読みとった後、Image Analyze II (富士フィルム社製) で画像処理を行った (BIO-imaging Analyzer BAS-2000IIシステム、富士写真フィルム株式会社)。それぞれのバンドに相当する放射線強度は、Image Analyze II上で数値定量化した。その結果、NaGLT1 mRNAは、腎臓の皮質部及び髓質部に多く発現することが認められた (図2A)。

### 【0037】

次に、RT-PCR法で調べるため、ラット各組織 (脳、心臓、肺、肝臓、小腸、脾臓、腎臓の皮質部、腎臓の髓質部) からRNeasy mini kit (QIAGEN社製) を用いて1μgの全RNAを得た後、SuperScript II reverse transcriptase (インビトロジエン社製) を用いて逆転写反応を行った。反応終了後残存RNAをRNase H (インビトロジエン社製) で分解した。得られた1本鎖DNAを鑄型として、NaGLT1、SGLT1、SGLT2及びGAPDHに特異的なプライマー (下記の表2及び配列表の配列番号13~20参照) とTaq DNA polymerase (Takara社製) を使用し、95°Cで3分間熱変性させた後、以下のサイクルを35回繰り返し増幅させた。サイクル：94°Cで1分間の熱変性、58°Cで1分間アニーリング、72°Cで1分間の伸長反応により得られたRT-PCR産物を1.5%のアガロースゲル上で分離した後、エチジウムプロマイドで染色、紫外線下で可視化した。その結果、腎臓 (皮質部、髓質部) でNaGLT1が高発現しており、腎臓以外にも、脳、肺及び肝臓でも検出限界以上の発現が認められた (

図2B)。

【0038】

【表2】

プライマー	遺伝子(GenBank アクセッション番号)	(位置)	配列番号
NaGLT1 (AB089802)			
Sense	5' - TGGGACCCACATTCAGAC - 3'	(279-298)	13
Antisense	5' - TCTGAGGCGGCTTCAAAGGATC - 3'	(736-757)	14
rSGLT1 (D16101)			
Sense	5' - ATGGACAGTAGCACCTTGAGCC - 3'	(170-191)	15
Antisense	5' - TAGCCCCAGAGAAGATGTCTGC - 3'	(647-668)	16
rSGLT2 (U29881)			
Sense	5' - CATTGTCTCAGGCTGGCACTGG - 3'	(851-872)	17
Antisense	5' - GGACACTGCCACAATGAACACC - 3'	(1289-1310)	18
rGAPDH (M17701)			
Sense	5' - CCTTCATTGACCTCAACTAC - 3'	(131-150)	19
Antisense	5' - GGAAGGCCATGCCAGTGAGC - 3'	(705-724)	20

【0039】

(マイクロダイセクション法によるラット腎尿細管分節の単離)

Wistar系雄性ラット（7週齢）をネンプタール麻酔下正中開腹し、左腎臓を露出させる。下大動脈の左腎動脈分岐点直前頭部側にて結紮する。下大動脈を左右分岐点直前頭部側にて結紮し、左腎動脈直下尾部側において血管に小孔を開ける。続いてその小孔よりポリエチレン医療用チューブ（PE-50, Becton Dickinson社製）を挿入し、10ml容量のシリンジを用いて過加圧にならないよう A

液 (130 mMのNaCl、5 mMのKCl、1 mMのNaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、1 mMの硫酸マグネシウム、1 mMの乳酸カルシウム、2 mMの酢酸ナトリウム、5.5 mM D-glucose、10 mMのHEPES、pH 7.4) 10 mlで左腎を前灌流する。灌流腎に鬱血等がないことを確認した後、B液 (1 mg/mlのcollagenase (type I, Sigma社製)、1 mg/mlのウシ血清アルブミン (BSA) (Sigma社製)、10 mMのバナジル酸リボヌクレオシドコンプレックス (インビトロジエン社製) 含有A液) 10 mlで灌流し、すばやく摘出する。

#### 【0040】

腎皮質から髓質にわたる角度で切断して厚さ1~1.5 mmの腎切片を作る。得られた腎切片を100%O<sub>2</sub>を用いて酸素化しながらB液中で37℃、30分間の振盪後、氷冷A液で腎切片を洗浄し、シリコナイズした鋭利な針を用いて以下の尿細管各分節をそれぞれの構造的特徴を基に顕微鏡で観察しながら分離する。単離した各ネフロン分節 (糸球体、近位曲尿細管、近位直尿細管、髓質ヘンレ太い上行脚、皮質ヘンレ太い上行脚、皮質集合管、髓質外層集合管、髓質内層集合管) を糸球体は20個、その他の分節は8 mmを1サンプルとして、それぞれの分節サンプルからRNeasy RNA mini kit (QIAGEN社製) を用いて全RNAを抽出した。得られた全RNAと下記の表3のプライマーセット (配列番号21~29) を用いてRT-PCRを行った (図3)。その結果、NaGLT1 mRNAは他のSGLTと同様、近位曲尿細管及び近位直尿細管で高発現することが明らかになった (図3)。

#### 【0041】

【表3】

プライマー	遺伝子(GenBankアクセスション番号)	(位置)	配列番号
NaGLT1 (AB089802)			
forward primer 5'- CCGGTGTCTCATTTGGTGTCT -3'		(526-547)	21
reverse primer 5'- ACCCAAGGCAGAACTGAAGTG -3'		(618-638)	22
TaqMan probe 5'- ACAAAAGGAGCCCCACATATTAGGCCTT -3'		(589-616)	23
rSGLT1 (D16101)			
forward primer 5'- CGAGGAGGACCCCTAAAGATACCA -3'		(1912-1934)	24
reverse primer 5'- GAACAGGTCAATGCCTTCCTGA -3'		(1977-1999)	25
TaqMan probe 5'- TGAAATAGATGCAGAAGCCCCCAGAAGG -3'		(1936-1964)	26
rSGLT2 (U29881)			
forward primer 5'- AAAATACGGCAGGAAGGAACGT -3'		(2117-2138)	27
reverse primer 5'- GACAATTGGCCACCATCTTG -3'		(2193-2213)	28
TaqMan probe 5'- CCAGTCCATTTGATTGGTTGTCACCTCCC -3'		(2163-2191)	29

## 【0042】

(NaGLT1 mRNA発現レベルの定量的解析)

Wistar系雄性ラット（7週齢）の腎臓由来全RNAを逆転写し（方法2参照）、得られた1本鎖DNAを鑄型として、NaGLT1、SGLT1、SGLT2及びGAPDHに特異的なプライマー及びTaqManプローブ（表3参照）とUniversal master mix (Applied Biosystems社製)を使用し、ABI PRISM 7700 Sequence Detection Systemを用いてNaGLT1、SGLT1、SGLT2及びGAPDH mRNA発現量を定量した。なお、標準曲線を求めるため、リアルタイムPCRで増幅したPCR産物をpGEM-T Easy vector (Promega社製)に挿入し、大腸菌（DH-5 $\alpha$ ）に形質転換した。形質転換した大腸菌を一晩LB培地（1L中に10gのバクトリプトン、5gのイーストエクストラクト及び10gのNaCl、pH 7.2）で振盪培養し、NaGLT1、SGLT1、SG

L T 2 及びG A P D H それぞれの増幅産物（表2のプライマーセットで増幅したP C R 断片）をコードしているプラスミドD N A の精製を行った。

#### 【0043】

それぞれの濃度をU V 1 2 0 0 分光光度計（島津社製）で測定し、既知濃度の対照遺伝子として使用した。PRISM 7700で得られた結果は、標準曲線を用いて数値化した。なお、内部標準として用いたG A P D H 発現量をリアルタイムP C R 各反応内における錆型R N A 量の補正に用いた。その結果、N a G L T 1 m R N A 発現量は、腎皮質及び髓質のいずれにおいても、他のS G L T と比較して高発現することが示された（図4）。

#### 【0044】

##### （N a G L T 1 の輸送基質）

アフリカツメガエル卵母細胞（以下卵母細胞と略す）発現系を用いて、N a G L T 1 の輸送活性について調べた。先ず、種々の糖類の選択性について調べるためにインビトロ合成N a G L T 1 R N A を卵母細胞に注入し、2日間18℃でインキュベートした後実験に供した。放射性標識した单糖類（ $\alpha$ -メチル-D-グルコピラノシド（ $\alpha$  M e G 1 c：代謝抵抗性グルコース）、ガラクトース、フルクトース、マンノース、マンニトール及び2-デオキシグルコース）並びに2糖類（スクロース）を基質として調べた結果、 $\alpha$  M e G 1 c 取り込みのみが、陰性対照として同時に調べた水注入卵母細胞と比較して有意に高かった（図5）。従って、N a G L T 1 の輸送基質がグルコースであることが明らかになった。

#### 【0045】

##### （N a G L T 1 を介した $\alpha$ M e G 1 c 輸送特性）

N a G L T 1 c R N A 注入細胞及び水注入卵母細胞の [U-<sup>14</sup>C] -  $\alpha$ -メチル-D-グルコピラノシド（ $\alpha$  M e G 1 c）、D- [1-<sup>14</sup>C] ガラクトース、D- [U-<sup>14</sup>C] マンノース、D- [U-<sup>14</sup>C] フルクトース、[1, 2-<sup>3</sup>H] - 2-デオキシグルコース、D- [1-<sup>3</sup>H] マンニトール、[U-<sup>14</sup>C] スクロースの取り込み活性を測定した。その際、9.6 mMのN a C l 、2 mMのK C l 、1.8 mMのC a C l 2 、1 mMのM g C l 2 、5 mMのH E P E S (p H 7.4) からなる緩衝液中でインキュベートした。また、細胞外N a<sup>+</sup>濃度

依存性を行う場合は、NaCLの濃度を9.6～96mMの間に調製し、96mMに不足する分を塩化コリンで補うこととし、最終的な浸透圧を一定にした（図6、7）。

### 【0046】

次に、NaGLT1発現卵母細胞を用いて、 $\alpha$ MeG1c取り込みの濃度依存性について調べた結果、Km値は3.71±0.09mMを示した（図6A）。また、NaGLT1を介した $\alpha$ MeG1c取り込みに対する細胞外Na<sup>+</sup>イオン濃度の影響について解析した。はじめに、rNaGLT1の $\alpha$ MeG1c取り込みに対する細胞外Na<sup>+</sup>の影響は、7μMのvalinomycin添加により膜電位差を無くした状態で、細胞外Na<sup>+</sup>の濃度を0～96mMまで変化させ検討した。インビトロ合成rNaGLT1 RNAを注入した細胞では細胞外Na<sup>+</sup>濃度依存的に $\alpha$ MeG1c取り込みは増大した。また、rNaGLT1の $\alpha$ MeG1c取り込みに対する用量依存性、あるいは細胞外Na<sup>+</sup>依存性の検討（図6A、6C）より、各々のV<sub>max</sub>値（最大輸送速度）、Km値を算出した。それらの値をもとにヒルプロット（横軸に変化させた基質またはイオンの濃度、縦軸にはそれぞれの基質（またはイオン）濃度の時の輸送速度VでV<sub>max</sub>を除したもの）の対数値をとる。）を行い（図6B、6D）、ヒル係数（直線の勾配）を算出した。その結果、 $\alpha$ MeG1c、Na<sup>+</sup>のヒル係数はそれぞれ1.06、1.00であり、 $\alpha$ MeG1cとNa<sup>+</sup>とのカップリング比は1:1であることが示された（図6）。従ってNaGLT1は、細胞外Na<sup>+</sup>イオン濃度依存的に機能するグルコーストランスポータであることが示唆された。

さらに、NaGLT1発現卵母細胞を介する[<sup>14</sup>C]標識 $\alpha$ MeG1c取り込みに対する種々阻害剤の影響について調べた結果、非標識 $\alpha$ MeG1c、D-グルコース、2-デオキシグルコース及びフロリジンは極めて強い阻害効果を有していた。フルクトースやフロレチンは弱い阻害効果を有していた。一方、L-グルコース、3-O-メチルグルコース、ガラクトース及びマンノースはNaGLT1を介した $\alpha$ MeG1c取り込みに対して影響を示さなかった（図7）。

### 【0047】

（抗NaGLT1抗体の作製）

N a G L T 1 のアミノ酸配列を基に、C末端側のペプチド (H<sub>2</sub>N-L P L D R K Q E K S I N S E G Q-COOH) (配列番号30) をN末端側をシステインとして作製した (サワディー・テクノロジー社に合成依頼)。高速液体クロマトグラフィー (H P C L) による分析の結果、合成されたペプチドの純度は92%であった。続いてヘモシアニン (keyhole limpet hemocyanin (Calbiochem-Behring社製)) を用い、このペプチドとのコンジュゲートを作製した。コンジュゲートは1mlずつ10本に分注し凍結保存した。

コンジュゲートはFreund完全アジュバント (Difco社製) を用いて均一なエマルジョンを作った。雄性日本白色家兎 (2kg) の前免疫血清を採取後、0.2mg/羽の割合で2週間間隔で免疫した。各免疫時に採血し、E L I S A法により抗体価の解析を行った。最終的に充分な抗体価が得られた後、全採血して抗血清として凍結保存した。

#### 【0048】

(イムノプロットによるN a G L T 1 の局在解析)

ペントバルビタール麻酔下Wistar系雄性ラット (220~230g) から各組織を取り出し、ホモジネートバッファー (230mMのスクロース、5mMのトリス/塩酸 (pH 7.5)、2mのエチレンジアミン四酢酸 (E D T A)、0.1mM フッ化フェニルメチルスルフォニル (P M S F) ) でホモジナイズした後、15分間の3000gでの遠心分離を行った。上清を取り分け、さらに30分間の24500gでの遠心分離を行い、沈殿物 (粗膜画分) を回収した。ラット腎刷子縁膜及び側底膜の調製はパーコール密度勾配遠心法 (Biochim Biophys Acta 773, 113-124, 1984) に従い同時調製した。膜サンプルはS D Sサンプルバッファー (2%のS D S、125mMのトリス、20%グルセロール) に可溶化しポリアクリラミド電気泳動 (Nature 227, 680-685, 1970) を行った。

#### 【0049】

分子量マーカーには、RainbowTM colored protein molecular weight markers [myosin (220,000), phosphorylase beta (97,400), BSA (66,000), ovalbumin (46,000), carbonic anhydrase (30,000), trypsin inhibitor (21,500), lysozyme (14,300)] (Amersham社製) を使用した。泳動の後、P V D F膜 (Immobi

n P、ミリポア社製) にタンパク質をトランスファー後、TBS-T (Tris buffered saline; 20 mMのTris/HCl (pH 7.5) 、137 mMのNaCl、0.1%のTween 20) でリンスした。次に5%のBSA含有TBS-Tで室温2時間ブロッキングした後、5% BSA含有TBS-Tで希釈した抗血清 (1:2000) と4℃、一晩反応させ、その後TBS-Tで15分、3回膜を洗浄した。そしてECL化学発光キット (Amersham社製) を用いてX線フィルム (富士フィルム社製) に感光させた。その結果、NaGLT1タンパク質は腎臓刷子縁膜に局在することが明らかになった (図8)。なお、図8中の左側は、抗NaGLT1抗体のみと反応させた場合、右側は予め抗原ペプチドで処理した抗NaGLT1抗体でを反応させた結果をそれぞれ示す。

### 【0050】

#### 【発明の効果】

腎性糖尿病は、腎臓におけるグルコース再吸収不全によるものであり、該グルコース再吸収不全はグルコーストランスポータ遺伝子の欠損によると考えられていた。本発明により、従来不明であった遺伝子が取得されたことにより、該遺伝子及び該遺伝子の発現産物であるグルコーストランスポータタンパク質を用いて、腎性糖尿病の解明、診断、予防・治療そのための薬剤の開発が可能となった。

例えば、本発明の遺伝子及びペプチド、更には該ペプチドに特異的に結合する抗体を用いて、例えば、ヒト腎におけるような新たなグルコーストランスポータ遺伝子の単離を行うことや、ヒトやラット組織細胞におけるグルコーストランスポータの発現を測定することが、新規遺伝子の単離やグルコーストランスポータの機能の診断、腎臓における遺伝子疾患の検出が可能となる。

### 【0051】

また、腎組織細胞のような組織細胞への本発明の遺伝子の導入や、本発明の遺伝子のアンチセンス鎖の導入による該遺伝子の発現抑制により、組織細胞におけるグルコーストランスポータ機能を調節することにより、腎遺伝子疾患の予防・治療を行うことも可能となる。更に、本発明の遺伝子の染色体上での欠損動物を作製することにより、グルコーストランスポータに着目した腎性糖尿病非ヒトモデル動物を作製することが可能である。該非ヒトモデル動物を用いることにより

、腎性糖尿病の予防及び治療のための新規薬剤の開発が可能となる。

【0052】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Japan Science and Technology Corporation

<120> Na<sup>+</sup>-dependent Glucose transporter 'NaGLT1' gene and its transcript  
ion-products.

<130> Y2002-P281

<140>

<141>

<160> 30

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 2173

<212> DNA

<213> Rattus norvegicus

<220>

<221> CDS

<222> (111)..(1562)

<400> 1

aaagaatctt ctggtagaa agaactgggg ctcagagctc cagggaccct ggcaaaaagc 60

tggacacctac caaaaaccct ttgtctggag ccaccaagct ggggtcgaa atg gag 116

Met Glu

1

ttc cgt ggg tcc ggg gcc act gct gtt gag cag cac ctc ctc cag tcc 164

Phe Arg Gly Ser Gly Ala Thr Ala Val Glu Gln His Leu Leu Gln Ser

5

10

15

gag acc cca ggg aag aat ggg ctg cag gcc aca tcg agt gac caa gtg 212

Glu Thr Pro Gly Lys Asn Gly Leu Gln Ala Thr Ser Ser Asp Gln Val

20

25

30

gga aga aca ctg cgc tgg ttc acc act gtg gtt ctg aat gct gct ttc 260

Gly Arg Thr Leu Arg Trp Phe Thr Thr Val Val Leu Asn Ala Ala Phe

35

40

45

50

ctg gga atg gga gtg agc gct gct gtg ctg gga ccc aca ttt cca gac 308

Leu Gly Met Gly Val Ser Ala Ala Val Leu Gly Pro Thr Phe Pro Asp

55

60

65

ctg gcc aga aac gtg aac cgg aac atc agc agc ctt tcc gaa atc ttc 356

Leu Ala Arg Asn Val Asn Arg Asn Ile Ser Ser Leu Ser Glu Ile Phe

70

75

80

gtg ggc cga gcc ctc tac ctg ggc tct gtg gtt ggt ggg gtg 404

Val Gly Arg Ala Leu Gly Tyr Leu Gly Gly Ser Val Val Gly Gly Val

85

90

95

ctt ttc gac tgc atg aat cat ttt cta ctt ttg ggg ctg tcc cac ctg 452  
 Leu Phe Asp Cys Met Asn His Phe Leu Leu Leu Gly Leu Ser His Leu  
 100 105 110

ctt act gcg gcc ggt ctt tac ctc act cct ttc tgt aaa aca gct gcc 500  
 Leu Thr Ala Ala Gly Leu Tyr Leu Thr Pro Phe Cys Lys Thr Ala Ala  
 115 120 125 130

tta ctg act gcc atg atg tct att acc ggt gtc tca ttt ggt gtt ctg 548  
 Leu Leu Thr Ala Met Met Ser Ile Thr Gly Val Ser Phe Gly Val Leu  
 135 140 145

gat aca ggt ggg aat gtc ctc atc ttg gac ctt tgg ggg gac aaa gga 596  
 Asp Thr Gly Gly Asn Val Leu Ile Leu Asp Leu Trp Gly Asp Lys Gly  
 150 155 160

gcc cca cat att cag gcc ttg cac ttc agt ttc gcc ttg ggt gcc ttc 644  
 Ala Pro His Ile Gln Ala Leu His Phe Ser Phe Ala Leu Gly Ala Phe  
 165 170 175

ctg gct ccc ctg ctg gct aaa ttg gcc tgg ggt acc aca gca tct gct 692  
 Leu Ala Pro Leu Leu Ala Lys Leu Ala Trp Gly Thr Thr Ala Ser Ala  
 180 185 190

cag aac cac aca gag cct cag tta gac cgt tca gcc ttg aac cga tcc 740  
 Gln Asn His Thr Glu Pro Gln Leu Asp Arg Ser Ala Leu Asn Arg Ser  
 195 200 205 210

ttt gaa gcc gcc tca gac tct gtg ttg gcg gta cct gac gac atg aat 788  
 Phe Glu Ala Ala Ser Asp Ser Val Leu Ala Val Pro Asp Asp Met Asn  
 215 220 225

ctt ctg tgg gcg tac gct tcc att gga acc tat gtt cta gta ctt tct 836  
 Leu Leu Trp Ala Tyr Ala Ser Ile Gly Thr Tyr Val Leu Val Leu Ser  
 230 235 240

gtc ttc ctg ttt gct cca ttc ttt aaa aag agg tca aag cag aaa aaa 884  
 Val Phe Leu Phe Ala Pro Phe Lys Lys Arg Ser Lys Gln Lys Lys  
 245 250 255

tcc gca gcg tct gct cag gga gct cga agg gct aaa tac cac agg gcc 932  
 Ser Ala Ala Ser Ala Gln Gly Ala Arg Arg Ala Lys Tyr His Arg Ala  
 260 265 270

ctg cta tgc ctc ctc ttc ctc ttc ttc tac gtg gga gcg gag 980  
 Leu Leu Cys Leu Leu Phe Leu Phe Phe Phe Tyr Val Gly Ala Glu  
 275 280 285 290

gtg acc tac ggc tct tac gta ttc tcc ttc gcc acc acc cac gtt ggc 1028  
 Val Thr Tyr Gly Ser Tyr Val Phe Ser Phe Ala Thr Thr His Val Gly  
 295 300 305

atg gaa gag agc gag gca gct ggc ttg aac tcc atc ttc tgg ggg acc 1076  
 Met Glu Glu Ser Glu Ala Ala Gly Leu Asn Ser Ile Phe Trp Gly Thr  
 310 315 320

ttc gca gcc tgc agg ggc ctg gcc atc ttc ttc gca acg ctc tta cag 1124

Phe Ala Ala Cys Arg Gly Leu Ala Ile Phe Phe Ala Thr Leu Leu Gln

325

330

335

cct ggg acc atg atg gtg ttg tgt aac att ggc agc ctg gcc tca tct 1172

Pro Gly Thr Met Met Val Leu Cys Asn Ile Gly Ser Leu Ala Ser Ser

340

345

350

ttc ttt ctg gtg ctt ttt gac aag agc cct ctt tgc ctc tgg atc gcg 1220

Phe Phe Leu Val Leu Phe Asp Lys Ser Pro Leu Cys Leu Trp Ile Ala

355

360

365

370

tct tct gtg tat gga gcc tca atg gct gcc acg ttt ccc agc ggc atc 1268

Ser Ser Val Tyr Gly Ala Ser Met Ala Ala Thr Phe Pro Ser Gly Ile

375

380

385

tcc tgg att gag cag tac acc acc tta act ggg aaa tcc gct gcg ttc 1316

Ser Trp Ile Glu Gln Tyr Thr Leu Thr Gly Lys Ser Ala Ala Phe

390

395

400

att ctg gtt ggt gct gcc ctg gga cta atg gcg act cct gca tta tct 1364

Ile Leu Val Gly Ala Ala Leu Gly Leu Met Ala Thr Pro Ala Leu Ser

405

410

415

gga att ctt cag gga cac tat ccc gat ctg cca gta att ctg tac atg 1412

Gly Ile Leu Gln Gly His Tyr Pro Asp Leu Pro Val Ile Leu Tyr Met

420

425

430

tgt ctg ggc tca gca gta tta aca act gtg tta ttc cct gtg atg tat 1460

Cys Leu Gly Ser Ala Val Leu Thr Thr Val Leu Phe Pro Val Met Tyr

435

440

445

450

aaa gta gcc acc tta cct ctg gat cga aag cag gaa aaa agc atc aac 1508

Lys Val Ala Thr Leu Pro Leu Asp Arg Lys Gln Glu Lys Ser Ile Asn

455

460

465

agt gag ggc cag aaa ata tta ctt tct agc tct agg cta atc aag gaa 1556

Ser Glu Gly Gln Lys Ile Leu Leu Ser Ser Ser Arg Leu Ile Lys Glu

470

475

480

gct aaa tgaaagagga aggggaaagg tgtgaaagca cgtgcgcgca tgtgtgcgca 1612

Ala Lys

tgcacgcgca cgcgtaatgg tttgcgggtg gttaaaatga agaatggac attctcta 1672

aaaaatacaa tagaaatgcc tttatataac ccatagctga ggtctctaag caactctcct 1732

gaaatattct gcagccaggg tcttctccag ctgacaggga gcacgcagtc atgaggcacc 1792

aggctcctg agaccctta cactgccctc attgaagtta tctctcagcc catgattcta 1852

ggaaagaaaa gtatttctaa aataaaatcc acgacttcca gagatcctgt aagacagctc 1912

tgagagatca atgtaactgc cagcaccttc ttcatttcca tgaagtgaga cacagaacag 1972

aaatagttt aaacgtatgc tcctgggct ggtgagatgg cttagtggtt aagagcactg 2032

actgctcttc caaaggtcct gagttcaat cccagcaacc acatggtggc tcacaactat 2092

ctgtaatgag atctgatgcc ttcttctgggt gtgtctgaag acagcgacag tgtactcata 2152

tacatcaaat aaataatatt t 2173

<210> 2

<211> 484

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<400> 2

Met Glu Phe Arg Gly Ser Gly Ala Thr Ala Val Glu Gln His Leu Leu  
 1 5 10 15

Gln Ser Glu Thr Pro Gly Lys Asn Gly Leu Gln Ala Thr Ser Ser Asp  
 20 25 30

Gln Val Gly Arg Thr Leu Arg Trp Phe Thr Thr Val Val Leu Asn Ala  
 35 40 45

Ala Phe Leu Gly Met Gly Val Ser Ala Ala Val Leu Gly Pro Thr Phe  
 50 55 60

Pro Asp Leu Ala Arg Asn Val Asn Arg Asn Ile Ser Ser Leu Ser Glu  
 65 70 75 80

Ile Phe Val Gly Arg Ala Leu Gly Tyr Leu Gly Gly Ser Val Val Gly  
 85 90 95

Gly Val Leu Phe Asp Cys Met Asn His Phe Leu Leu Leu Gly Leu Ser

100 105 110

His Leu Leu Thr Ala Ala Gly Leu Tyr Leu Thr Pro Phe Cys Lys Thr

115 120 125

Ala Ala Leu Leu Thr Ala Met Met Ser Ile Thr Gly Val Ser Phe Gly

130 135 140

Val Leu Asp Thr Gly Gly Asn Val Leu Ile Leu Asp Leu Trp Gly Asp

145 150 155 160

Lys Gly Ala Pro His Ile Gln Ala Leu His Phe Ser Phe Ala Leu Gly

165 170 175

Ala Phe Leu Ala Pro Leu Leu Ala Lys Leu Ala Trp Gly Thr Thr Ala

180 185 190

Ser Ala Gln Asn His Thr Glu Pro Gln Leu Asp Arg Ser Ala Leu Asn

195 200 205

Arg Ser Phe Glu Ala Ala Ser Asp Ser Val Leu Ala Val Pro Asp Asp

210 215 220

Met Asn Leu Leu Trp Ala Tyr Ala Ser Ile Gly Thr Tyr Val Leu Val

225 230 235 240

Leu Ser Val Phe Leu Phe Ala Pro Phe Phe Lys Lys Arg Ser Lys Gln

245 250 255

Lys Lys Ser Ala Ala Ser Ala Gln Gly Ala Arg Arg Ala Lys Tyr His

260

265

270

Arg Ala Leu Leu Cys Leu Leu Phe Leu Phe Phe Phe Tyr Val Gly

275

280

285

Ala Glu Val Thr Tyr Gly Ser Tyr Val Phe Ser Phe Ala Thr Thr His

290

295

300

Val Gly Met Glu Glu Ser Glu Ala Ala Gly Leu Asn Ser Ile Phe Trp

305

310

315

320

Gly Thr Phe Ala Ala Cys Arg Gly Leu Ala Ile Phe Phe Ala Thr Leu

325

330

335

Leu Gln Pro Gly Thr Met Met Val Leu Cys Asn Ile Gly Ser Leu Ala

340

345

350

Ser Ser Phe Phe Leu Val Leu Phe Asp Lys Ser Pro Leu Cys Leu Trp

355

360

365

Ile Ala Ser Ser Val Tyr Gly Ala Ser Met Ala Ala Thr Phe Pro Ser

370

375

380

Gly Ile Ser Trp Ile Glu Gln Tyr Thr Thr Leu Thr Gly Lys Ser Ala

385

390

395

400

Ala Phe Ile Leu Val Gly Ala Ala Leu Gly Leu Met Ala Thr Pro Ala

405

410

415

Leu Ser Gly Ile Leu Gln Gly His Tyr Pro Asp Leu Pro Val Ile Leu

420

425

430

Tyr Met Cys Leu Gly Ser Ala Val Leu Thr Thr Val Leu Phe Pro Val

435

440

445

Met Tyr Lys Val Ala Thr Leu Pro Leu Asp Arg Lys Gln Glu Lys Ser

450

455

460

Ile Asn Ser Glu Gly Gln Lys Ile Leu Leu Ser Ser Ser Arg Leu Ile

465

470

475

480

Lys Glu Ala Lys

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence:T3-1 forward  
primer

&lt;400&gt; 3

tcggaaatgg agttccgtgg 20

<210> 4

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:T3-2 forward  
primer

<400> 4

agctgcctta ctgactgcctt tg 22

<210> 5

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:T3-3 forward  
primer

<400> 5

tacgtattct ctttcgcac c 21

<210> 6

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:T3-4 forward

primer

<400> 6

tgtgtAACAT tggcagcctg g

21

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:T3-5 forward

primer

<400> 7

taacccatAG ctgaggTCTC

20

<210> 8

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:T7-1 reverse  
primer

<400> 8

cagatagttg tgagccacca tgtg

24

<210> 9

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:T7-2 reverse  
primer

<400> 9

gagttgctta gagacctcag c

21

<210> 10

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:T7-3 reverse  
primer

<400> 10

agggtggtgta ctgctcaatc c 21

<210> 11

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:T7-4 reverse  
primer

<400> 11

tctgaggcgg cttcaaagga tc 22

<210> 12

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:T7-5 reverse  
primer

<400> 12

aaaagcaccc caccaaccac ag

22

<210> 13

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:NaGLT1 sense  
primer

<400> 13

tgggacccac atttccagac

20

<210> 14

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:NaGLT1  
antisense primer

<400> 14

tctgaggcgg cttcaaaggta tc

22

<210> 15

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Rat SGLT1

sense primer

<400> 15

atggacagta gcaccccttgc cc 22

<210> 16

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Rat SGLT1

antisense primer

<400> 16

tagcccccaga gaagatgtct gc 22

<210> 17

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Rat SGLT2 sense  
primer

<400> 17

cattgtctca ggctggcact gg

22

<210> 18

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Rat SGLT2  
antisense primer

<400> 18

ggacactgcc acaatgaaca cc

22

<210> 19

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Rat GAPDH sense  
primer

<400> 19

ccttcattga cctcaactac

20

<210> 20

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Rat GAPDH  
antisense primer

<400> 20

ggaaggccat gccagtgagc

20

<210> 21

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:NaGLT1 forward  
primer

<400> 21

ccgggtgtctc atttgggttt ct

22

<210> 22

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:NaGLT1 reverse

primer

<400> 22

acccaaggcgcg aaactgaagt g

21

<210> 23

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:NaGLT1 TaqMan

probe

<400> 23

acaaaggagc cccacatatt caggcatt

28

<210> 24

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Rat SGLT1

forward primer

<400> 24

cgaggaggac cctaaagata cca

23

<210> 25

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Rat SGLT1

reverse primer

<400> 25

gaacaggtca tatgccttcc tga

23

<210> 26

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Rat SGLT1

TaqMan probe

<400> 26

tgaaatagat gcagaagccc cccagaagg

29

<210> 27

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Rat SGLT2

forward primer

<400> 27

aaaatacggc aggaaggaac tg

22

<210> 28

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence:Rat SGLT2  
reverse primer

&lt;400&gt; 28

gacaaattgg ccaccatctt g 21

&lt;210&gt; 29

&lt;211&gt; 29

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence:Rat SGLT2  
TaqMan probe

&lt;400&gt; 29

ccagtccatt tgattggttg tcacttccc 29

&lt;210&gt; 30

&lt;211&gt; 16

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence:NaGLT1

## C-terminal peptide

&lt;400&gt; 30

Leu Pro Leu Asp Arg Lys Gln Glu Lys Ser Ile Asn Ser Glu Gly Gln  
 1 5 10 15

## 【図面の簡単な説明】

## 【図 1】

本発明の実施例において、Aは本発明のNaGLT1の塩基配列及びアミノ酸配列を、Bは本発明のNaGLT1のアミノ酸配列のハイドロパシープロット（疎水性分析）を示す図である。

## 【図 2】

本発明の実施例において、Aは本発明のラット細胞におけるNaGLT1 mRNAのノーザンプロット分析を、Bは本発明のラット細胞におけるNaGLT1 mRNAをPCRにより検出したことを示す図である。

## 【図 3】

本発明の実施例における、本発明のNaGLT1、SGLT1、SGLT2及びGAPDHのmRNAをPCRにより検出し、それぞれのmRNAについて腎臓内での発現分布を示す図である。なお、図中の+は逆転写酵素を含む条件で、-は逆転写酵素を含まない条件でRT-PCRを行ったものをそれぞれ示す。

## 【図 4】

本発明の実施例における、本発明のNaGLT1、SGLT1及びSGLT2 mRNAの発現量をリアルタイムPCRによって定量解析したことを示す図である。

## 【図 5】

本発明の実施例における、本発明のNaGLT1 mRNAをインビトロ合成し、注入した卵母細胞と、水注入卵母細胞における各種糖類蓄積を示す図である。

**【図6】**

本発明の実施例において、Aは本発明のNaGLT1発現卵母細胞における [ $^{14}\text{C}$ ]  $\alpha$  MeGlc蓄積量と  $\alpha$  MeGlc自身の依存関係を、BはAのデータを用いたHillプロットを、Cは [ $^{14}\text{C}$ ]  $\alpha$  MeGlc蓄積量と細胞外Na<sup>+</sup>イオン濃度の依存関係を、DはCのデータを用いたHillプロットを示す図である。

**【図7】**

本発明の実施例における、本発明のNaGLT1発現卵母細胞及び水注入卵母細胞における、 [ $^{14}\text{C}$ ]  $\alpha$  MeGlc蓄積に対する各種糖類の影響を示す図である。

**【図8】**

本発明の実施例における、ラット腎臓膜部位（腎粗膜、刷子縁膜、及び側底膜）におけるNaGLT1タンパク質の細胞内局在を、イムノプロットにより解析した結果を示す図である。

【書類名】

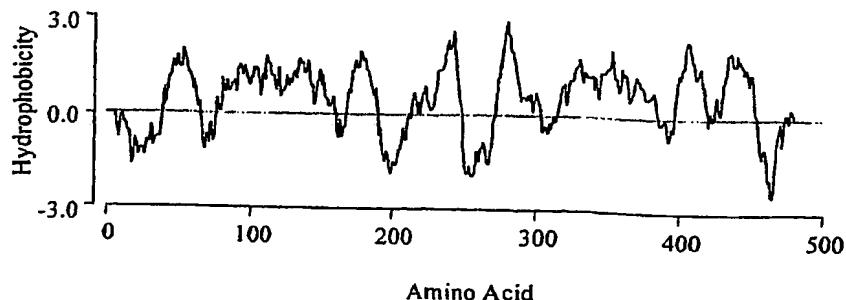
図面

【図1】

A

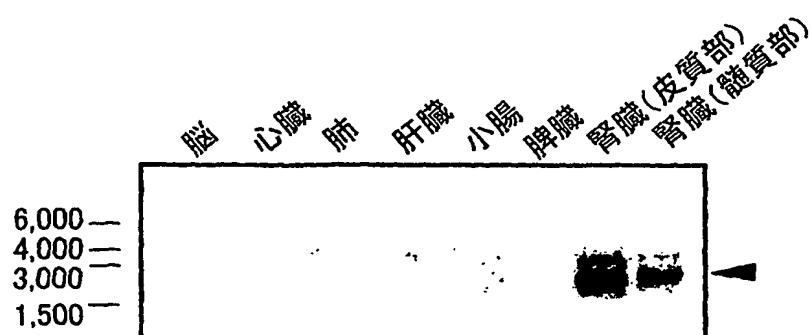
-110                    AAAAGAATCTCTGGTTAGAAAGAACTGGGCTCAGAGCTCCAGGGACCT    -61  
 -60    GGCAAAAGCTGGACCTCACC AAAAACCTTTGCTGGAGCCACCAAGCTGGGTCGAA    -1  
 1       ATGGAGTTCCGTGGGTCCGGGGCACTGCTGTTGAGCAGCACCTCTCCAGTCCGAGACC    60  
 M   E   F   R   G   S   G   A   T   A   V   E   Q   H   L   L   Q   S   E   T  
 61       CCAGGGAAAGATGGGCTGCAGGCCACATCGAGTGACCAAGTGGGAGAACACTGCGCTGG    120  
 P   G   K   N   G   L   Q   A   T   S   S   D   Q   V   G   R   T   L   R   W  
 121       TTCACCAACTGTGGTTCTGAATGCTGCTTCTGGGAATGGGAGTGAGGCCGTGCTGTGCTG    180  
 P   T   T   V   V   L   N   A   A   F   L   G   M   G   V   S   A   A   V   L  
 181       GGACCCACATTCAGACCTGGCCAGAAACGTGAACCGGAACATCAGCAGCCTTCCGAA    240  
 G   P   T   F   P   D   L   A   R   N   V   N   R   N   I   S   S   L   S   E  
 241       ATCTCGTGGGCCGAGCCCTGGCTACCTGGGCCCTCTGGTTGGTGGGTGCTTTTC    300  
 I   F   V   G   R   A   L   G   Y   L   G   G   S   V   V   G   G   V   L   F  
 301       GACTGCATGAATCATTTCTACTTTGGGCTGCCCACCTGCTACTGCGGCCGGTCTT    360  
 D   C   M   N   H   P   L   L   G   L   S   H   L   T   A   A   G   L  
 361       TACCTCACTCCTTCTGAAAACAGCTGCCCTACTGACTGCCATGATGTCTATTACCGGT    420  
 Y   L   T   P   F   C   K   T   A   A   L   T   A   M   M   S   I   T   G  
 421       GTCTCATTTGGTGTCTGGATACAGGTGGGAATGCTCTCATCTGGACCTTGGGGGAC    480  
 V   S   F   G   V   L   D   T   G   G   N   V   L   I   D   L   W   G   D  
 481       AAAGGAGCCCCACATATTCAAGGCTTCCACTTCAGTTGCCCTGGGTGCCCTGGCT    540  
 K   G   A   P   H   I   Q   A   L   H   F   S   F   A   L   G   A   F   L   A  
 541       CCCCTGAGCTGCTAAATTGGGCTGGGTACACAGCATGCTCAGAACACACAGAGCCT    600  
 P   L   P   L   A   W   G   T   T   A   S   A   Q   N   H   T   E   P  
 601       CAGTTAGACCGTTCAAGGCTTGACCGATCTTTGAAGGGCCCTCAGACTCTGTGTTGGC    660  
 Q   L   D   R   S   A   L   N   R   S   F   E   A   A   S   D   S   V   L   A  
 661       GTACCTGACGACATGATCTCTGTGGGCGTACGCTTCCATTGGAACCTATGTTCTAGTA    720  
 V   P   D   D   M   N   L   W   A   Y   A   S   I   G   T   Y   V   L   V  
 721       CTTTCTGCTTCTCTGTTGCTCATTCTTAAAAGAGGTCAAAGCAGAAAAATCCCA    780  
 L   S   V   F   L   F   A   P   F   F   K   K   R   S   K   Q   K   K   S   A  
 781       GCGTCTGCTCAGGGAGCTGAAGGGCTAAATCACACAGGGCCCTGCTATGCCCTCTTC    840  
 A   S   A   Q   G   A   R   R   A   K   Y   H   R   A   L   L   C   L   L   P  
 841       CTCCTCTCTCTCTACGTGGGAGGGAGGTGACCTACGGCTCTTACGTATTCTCTTC    900  
 L   F   F   P   F   Y   V   G   A   E   V   T   Y   G   S   Y   V   F   S   P  
 901       GCCACCAACCCACGGTGGCATGGAAAGAGCGAGGCGACCTGGCTTGAACCTCCATCTCTGG    960  
 A   T   T   H   V   G   M   E   E   S   E   A   A   G   L   N   S   I   F   W  
 961       GGGACCTTCCGACCCCTGAGGGCCCTGCCATCTCTCGCAACGCTCTAACGCCCTGG    1020  
 G   T   F   A   A   C   R   G   L   A   I   F   F   A   T   L   L   Q   P   G  
 1021       ACCATGATGGTGTGTTAACATTGGCAGCTGGCTCATCTTCTGGTGTCTTTT    1080  
 T   M   M   V   L   C   N   I   G   S   L   A   S   S   F   F   L   V   L   P  
 1081       GACAAGGCCCTTGGCTCTGGATGGCTCTGTGATGGGCCATGGCTGCC    1140  
 D   K   S   P   L   C   L   W   I   A   S   S   V   Y   G   A   S   M   A   A  
 1141       ACCTTTCCAGCGGCATCTCTGGATTGACGAGTACACCCCTTAACGGAAATCCGCT    1200  
 T   F   P   S   G   I   S   W   I   E   Q   Y   T   T   L   T   G   K   S   A  
 1201       GCGTTCATCTGGTGGCTGCCCTGGACTAATGGGACTCTGCAATTATGGAAATT    1260  
 A   F   I   L   V   G   A   A   L   G   L   M   A   T   P   A   L   S   G   I  
 1261       CTTCAAGGGACACTATCCCGATCTGCCAGTAATTCTGATCATGGCTCTGGCTCAGCAGTA    1320  
 L   Q   O   G   H   Y   P   D   P   V   I   L   Y   M   C   L   G   S   A   V  
 1321       TTAAACAATGTTATCTCTGTGATGATAAGTAGGCCACCTTACCTCTGGATCGAAAG    1380  
 L   T   T   V   L   F   P   V   M   Y   K   V   A   T   L   P   D   R   K  
 1381       CAGGAAAAAAGCATCACAGTGAGGGCAGAAAATATTACTTTCTAGCTCTAGGCTAAC    1440  
 Q   E   K   S   I   N   S   E   G   Q   K   I   L   L   S   S   R   L   I  
 1441       AAGGAAGCTAAATGAAGAGGAAGGGAAAGGTGTGAAGACGTGCGCGTGTGCG    1500  
 K   E   A   K  
 1501       CATGCACCGCAGCGTAAATGGTTTGGGTGGTAAATGAGAATGGGACATTCTCA    1560  
 1561       ATAAAAAATACAATAGAAATTTCTTATAAACCACTATGGCTCTCAAGCAACTCTC    1620  
 1621       CTGAAATATTCTGCACCCAGGGCTCTCTCAGCTGACAGGAGCACCGAGTCATGAGCA    1680  
 1681       CCAGGTCTCTGAGACCCCTACACTGCCCTCATGGAGTTATCTCTAGCCCATGATTG    1740  
 1741       TAGGAAAGAAAAGTATTCTAAAATAAACCTACAGCTCCAGAGATCTGTAAAGCACAGC    1800  
 1801       TCTGAGAGATCAATGTAACTGCCACCCCTCTCATTCTCTGAGATGGCTAGGAGACACAGA    1860  
 1861       AGAAATAGTTTAAACGTATGCTCTGGGGCTGGTGAAGATGGCTAGGTTAAGAGCAC    1920  
 1921       TGACTGCTCTCCAAAGCTCTGAGTTCAAAATCCCAGAACACATGGGGCTCACAACT    1980  
 1981       ATCTGTAATGAGATCTGATGCCCTCTCTGAGTGAAGACAGCGACAGTGTACTCA    2040  
 2041       TATACATCAAATAAAATATT 2063

B



【図2】

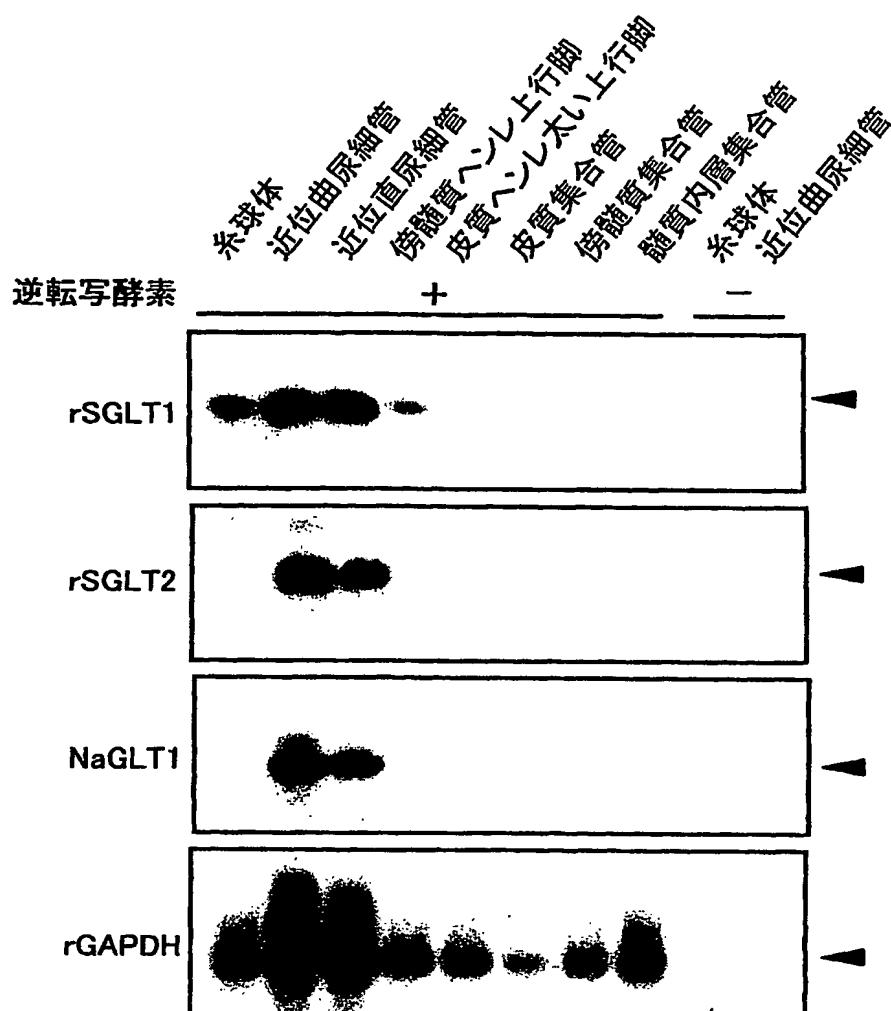
A



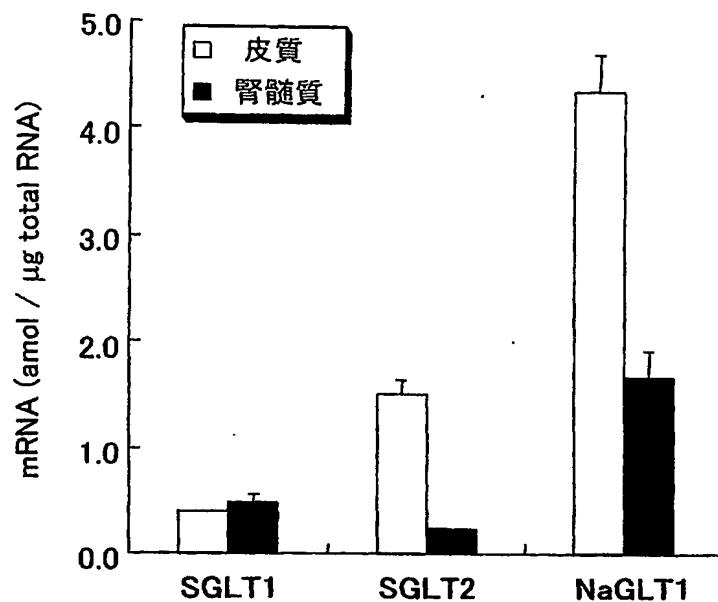
B



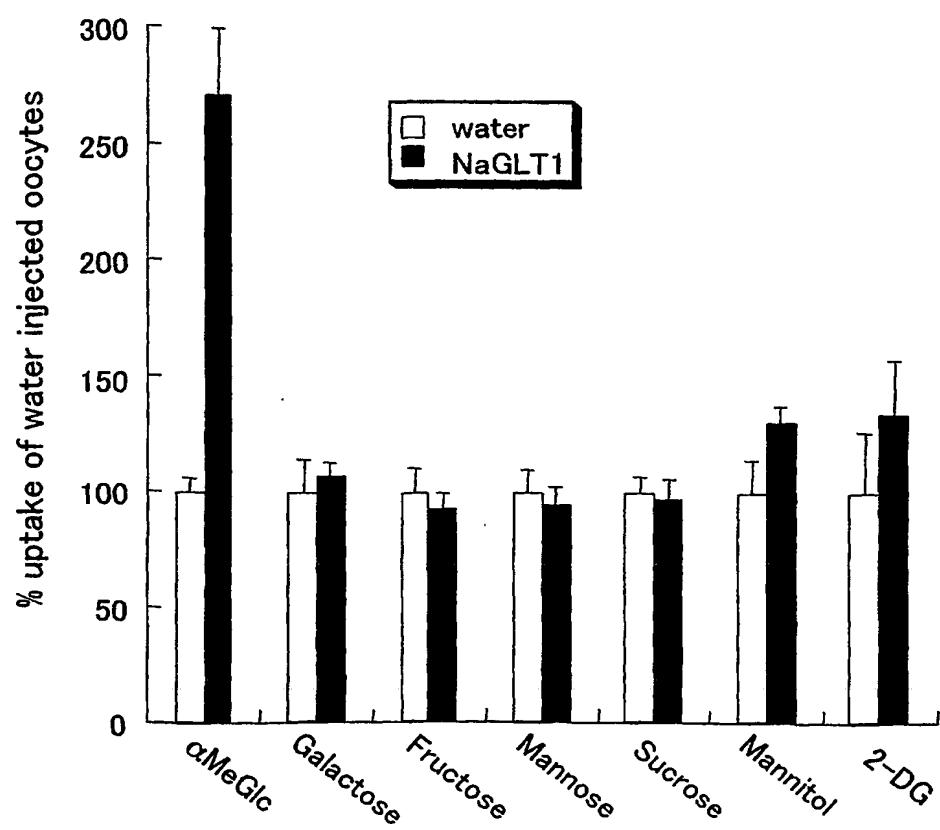
【図3】



【図4】

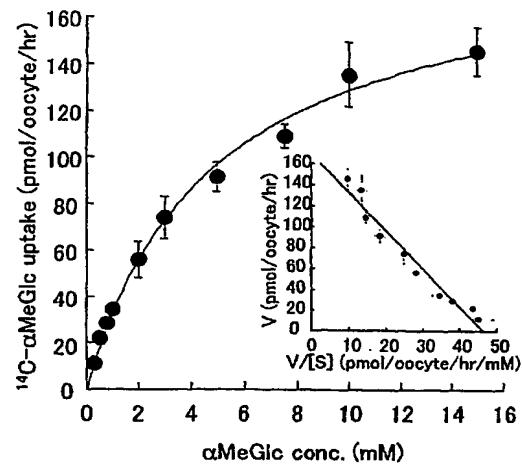


【図5】

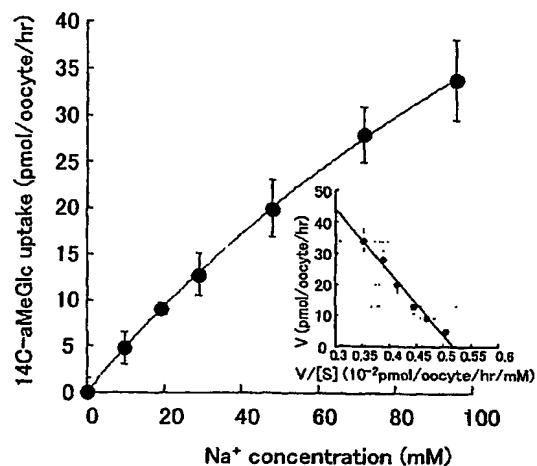


【図 6】

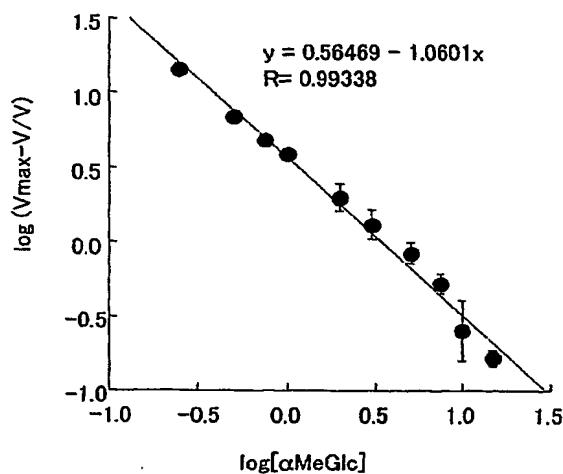
A



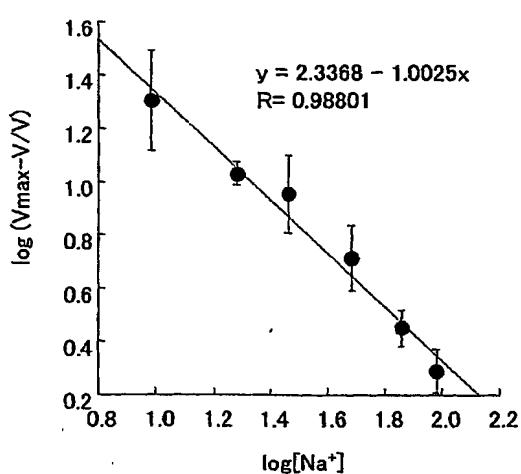
C



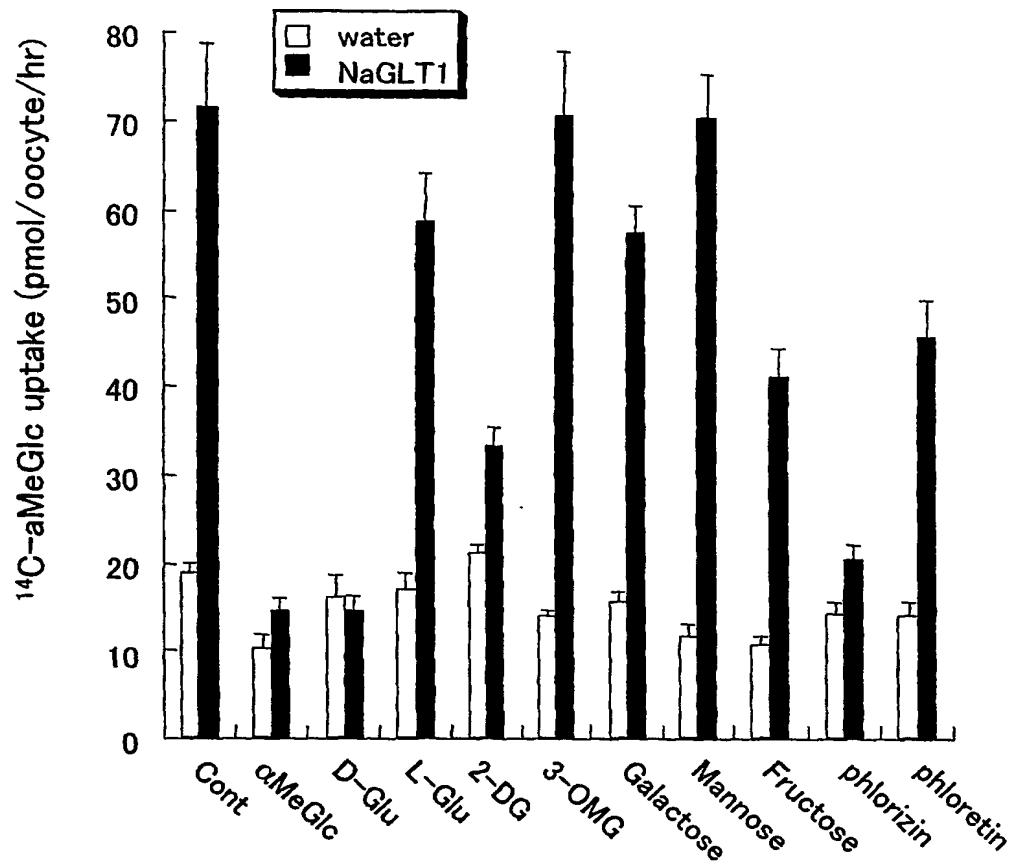
B



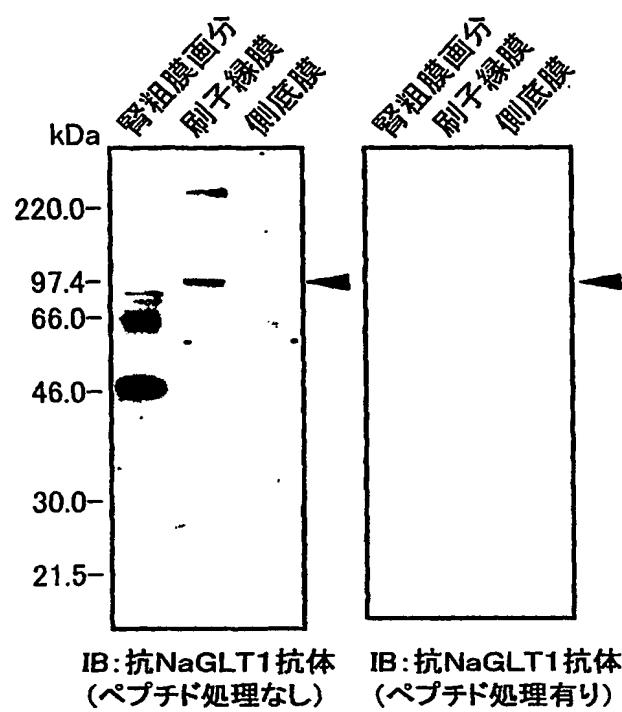
D



【図7】



【図8】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 腎性糖尿病に関する新規グルコーストランスポータ、その遺伝子、及びそれらの変異体、及び、それらの利用を提供すること。

【解決手段】 本発明のグルコーストランスポータ及びその遺伝子は、腎性糖尿病に関するグルコーストランスポータ及びその遺伝子であり、該タンパク質及び遺伝子は、腎臓で高発現し、腎でのグルコース再吸収において、より大きな寄与を果たす新規タンパク質及びその遺伝子からなる。本発明は、該タンパク質及び遺伝子の変異体、及び該タンパク質に特異的に結合する抗体を包含する。更に、本発明は、本発明の遺伝子を染色体上で欠損させたモデル非ヒト動物、腎性糖尿病の予防・治療薬のスクリーニング方法、該遺伝子や抗体を用いたグルコーストランスポータ機能や腎疾患の診断方法や本発明の遺伝子を組織細胞に導入して該組織細胞のトランスポータ機能を調節する方法も包含する。

【書類名】 出願人名義変更届（一般承継）  
【提出日】 平成15年10月31日  
【あて先】 特許庁長官 殿  
【事件の表示】  
【出願番号】 特願2002-363014  
【承継人】  
【識別番号】 503360115  
【住所又は居所】 埼玉県川口市本町四丁目1番8号  
【氏名又は名称】 独立行政法人科学技術振興機構  
【代表者】 沖村 憲樹  
【連絡先】 〒102-8666 東京都千代田区四番町5-3 独立行政法人科学技術振興機構 知的財産戦略室 佐々木吉正 TEL 03-5214-8486 FAX 03-5214-8417  
【提出物件の目録】  
【物件名】 権利の承継を証明する書面 1  
【援用の表示】 平成15年10月31日付提出の特第許3469156号にかかる一般承継による移転登録申請書に添付のものを援用する。  
【物件名】 登記簿謄本 1  
【援用の表示】 平成15年10月31日付提出の特第許3469156号にかかる一般承継による移転登録申請書に添付のものを援用する。

特願 2002-363014

出願人履歴情報

識別番号 [396020800]

1. 変更年月日 1998年 2月24日

[変更理由] 名称変更

住 所 埼玉県川口市本町4丁目1番8号  
氏 名 科学技術振興事業団

特願 2002-363014

出願人履歴情報

識別番号

[503360115]

1. 変更年月日 2003年10月 1日

[変更理由] 新規登録

住所 埼玉県川口市本町4丁目1番8号  
氏名 独立行政法人 科学技術振興機構